

肺泡上皮细胞在高氧急性肺损伤中的作用研究^①

刘芳君, 龚财惠, 刘 莎

重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 儿科学重庆市重点实验室,

儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014

摘要: 目的: 观察新生小鼠肺组织甲状腺转录因子[TTF-1]及肺表面活性物质蛋白 B[SP-B]的表达, 探讨高氧急性肺损伤[HALI]可能存在的损伤机制. 方法: 新生 1 d 的 C57BL/6 小鼠 30 只, 随机分为: 高氧暴露组及空气对照组, 每组 15 只. 高浓度氧暴露 72 h 建立 ALI 小鼠模型, 各组于 24, 48 及 72h 随机取 5 只小鼠肺组织标本, 测定肺湿/干重(W/D)比值、观察肺组织形态学变化并进行病理评分及肺泡计数(RAC), 荧光定量 PCR 法及免疫荧光标记法检测各组各实验点 TTF-1, SP-B mRNA 及蛋白的表达情况. 结果: 与空气对照组比较, 高氧暴露 48 h 时, 肺组织出现肺泡间质细胞数量增多及肺水肿等 HALI 的表现; W/D 比值及病理评分显著升高($P < 0.05$); RAC 显著减少($P < 0.05$). 高氧暴露 72 h 时, TTF-1, SP-B mRNA 及蛋白表达较空气对照组下调($P < 0.05$). 结论: 高浓度氧暴露能导致 ALI, 肺泡上皮细胞的损伤在 HALI 发生进程中可能发挥重要作用.

关键词: 高氧急性肺损伤; 肺泡上皮细胞; 甲状腺转录因子; 肺表面活性物质蛋白 B; 新生小鼠

中图分类号: R722

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2018)05-0095-06

高氧急性肺损伤(hyperoxic acute lung injury, HALI)是早产儿尤其是极低体重出生儿高浓度氧疗后常见的并发症之一, 主要表现为肺组织充血水肿、大量炎性物质渗出等病理改变, 临床高浓度氧疗导致的肺组织损伤虽已引起人们的高度重视, 但其确切的发病机制有许多环节尚未明确^[1]. 肺泡 II 型上皮细胞(type II alveolar epithelial cells, AEC II)是肺组织的一种多功能细胞, 控制水钠转运, 参与肺损伤修复及炎症反应等病理过程, 对维持肺泡结构及正常的气体交换功能有重要的作用^[2]. 本研究旨在通过动态观察 HALI 新生鼠肺组织病理变化、肺泡上皮细胞类标记的表达, 探讨肺泡上皮细胞损伤后的变化, 为临床 HALI 的预防及治疗提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材 料

SPF 级健康新生 1 d C57BL/6 小鼠 30 只, 雌雄不限, 购自重庆医科大学动物实验中心. 兔抗小鼠 TTF-1 单抗(Epitomics); 山羊抗小鼠 SP-B 多抗(Santa Cruz); CY3 标记的抗山羊 IgG 及 DAPI(碧云天); CY3 标记抗兔 IgG(中杉金桥); 总 RNA 快速提取试剂盒(Bioteke); PrimeScript RT reagent Kit(TaKa-Ra); RealMasterMix(TIANGEN); TTF-1 及 SP-B 引物(生工); 100%氧气(重庆朝阳气体); CY100 型数字测氧仪(杭州立华仪器); 自制有机玻璃氧箱(30 cm×20 cm×20 cm); 荧光显微镜及图像采集系统

① 收稿日期: 2016-03-02

作者简介: 刘芳君(1983-), 女, 湖南湘乡人, 主治医师, 主要从事小儿呼吸系统疾病及肺功能检测.

通信作者: 刘 莎, 主治医师.

(Nikon).

1.2 方 法

1) HALI 新生小鼠模型的制备及分组: 新生 1 d C57BL/6 小鼠 30 只随机分为高氧暴露组和空气对照组, 每组 15 只. 高氧暴露组: 与哺乳母鼠共置于密闭氧箱, 持续通入 100% 氧气(3 L/min), 测氧仪监测 FiO_2 (维持 0.85), 钠石灰吸收 CO_2 (浓度 $<0.5\%$), 环境温度 $23\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\%\sim 65\%$, 为防止母鼠氧损害每日与空气对照组交换母鼠^[3], 添加水、饲料及更换垫料. 空气对照组: FiO_2 : 0.21(空气), 实验条件与高氧暴露组相同^[3]. 两组于 24, 48 及 72 h, 随机挑选 5 只小鼠, 水合氯醛麻醉后分离肺组织备用.

2) 湿/干重(W/D)比值的测定: W/D 是衡量肺组织含水量的重要客观指标, 间接反映 ALI 的损伤程度. 取右肺无菌纱布蘸去其表面血迹和水分, 称湿重, 置于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱烘干至质量不再变化, 称干重, 计算比值^[3].

3) 病理检测: 两组于各实验点分离左肺上叶组织, 固定、包埋, 制成 $4\mu\text{m}$ 的切片, 常规脱蜡、脱水, 行 HE 染色. ①观察肺组织形态变化, 进行病理评分^[4]. ②放射状肺泡计数(radical alveolar counts, RAC): 呼吸性细支气管中心至最近胸膜垂直线上的肺泡数量, 其反映了终末呼吸单位的肺泡数, 是肺泡化程度的重要检测指标. 随机抽取 5 张 HE 切片, 随机取 5 个视野($\times 200$)/张, 计算均值.

4) 荧光定量 PCR 检测 TTF-1 及 SP-BmRNA 的表达: 两组于各实验点取左肺下叶组织, 均浆, 提取肺组织总 RNA, 根据总 RNA 浓度逆转录合成 $20\mu\text{L}$ cDNA 备用, 提取 RNA 及逆转录合成 cDNA 均按说明书严格操作. 引物序列由生工设计合成: TTF-1(F: $5'-\text{GGAAGCCATGCAGAGGTTAG}-3'$, R: $5'-\text{GAGCCCAAATCAACATCCGAG}-3'$), SP-B(F: $5'-\text{TGCCCTGGTTATTGACTACTT}-3'$, R: $5'-\text{CCTGGATTCTGTTCTGGCTTAG}-3'$), β -actin(F: $5'-\text{TGGCATTGTTACCAACTGGGAC}-3'$, R: $5'-\text{TCACGGTTGGCCTTAGGGTTC}-3'$). 反应条件: 第一步 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; 第二步 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环. 溶解曲线分析: 从 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 速度每隔 5 s 计算荧光值^[3]. 采用相对定量法, 测定 Ct 值, 代入公式 $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$ 计算^[3]. 实验重复 5 次.

5) 免疫荧光标记法检测 TTF-1 及 SP-B 蛋白的表达: 切片脱蜡, 逐级酒精至水化; 按说明书进行操作(兔抗鼠 TTF-1 [1:300]; 山羊抗小鼠 SP-B [1:200]), 阴性对照以 0.01 M PBS 液代替一抗. 实验重复 5 次. Nikon 55I 荧光显微镜采集荧光图像, 红色荧光为 SP-B 及 TTF-1 的阳性细胞.

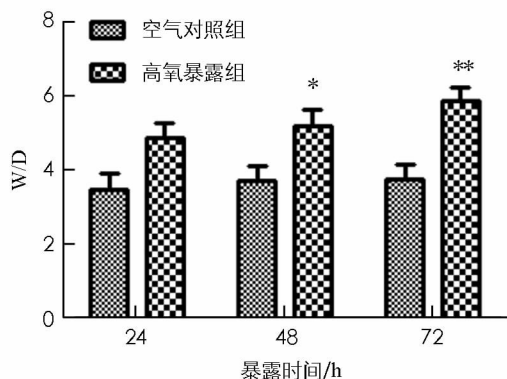
1.3 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 5.01 软件, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间两两比较采用 t 检验, $P<0.05$ 有统计学差异.

2 结 果

1) 肺组织湿/干重(W/D)比值: 与空气对照组比较, 48 h 高氧暴露组肺组织 W/D 比值显著升高, 差异有统计学意义($t=2.542$, $P<0.05$); 且随着给氧时间的延长, 差异更为明显($t=3.675$, $P<0.01$)(图 1).

2) 肺组织病理变化及评分: 空气对照组肺泡形态完整, 大小均匀, 无充血及炎性渗出, 间隔无增厚. 与空气对照组比较, 48 h 高氧暴露组肺组织充血, 肺泡形态不完整, 大小不均, 部分肺泡融合, 数目减少, 可见少量红细胞及脱落的肺泡上皮细胞, 炎性细胞浸润, 间质水肿增厚; 高氧暴露 72 h, 肺组织结构紊乱, 肺泡数量明显减



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图 1 两组各实验点肺 W/D 比值

少, 可见大量白细胞及红细胞渗出, 间质水肿增宽明显(图 2). 高氧暴露 48 及 72 h 组肺组织病理评分均较空气对照组显著升高($t=3.113, t=4.358, P<0.01$)(图 3).

3) 肺组织放射状肺泡计数: 空气对照组随着生长时间的延长 RAC 数量逐渐增多; 高氧暴露组 48 h RAC 较空气对照组显著减少($t=3.009, P<0.05$), 随着给氧时间的延长, RAC 降低更加明显($t=3.968, P<0.01$)(图 4).

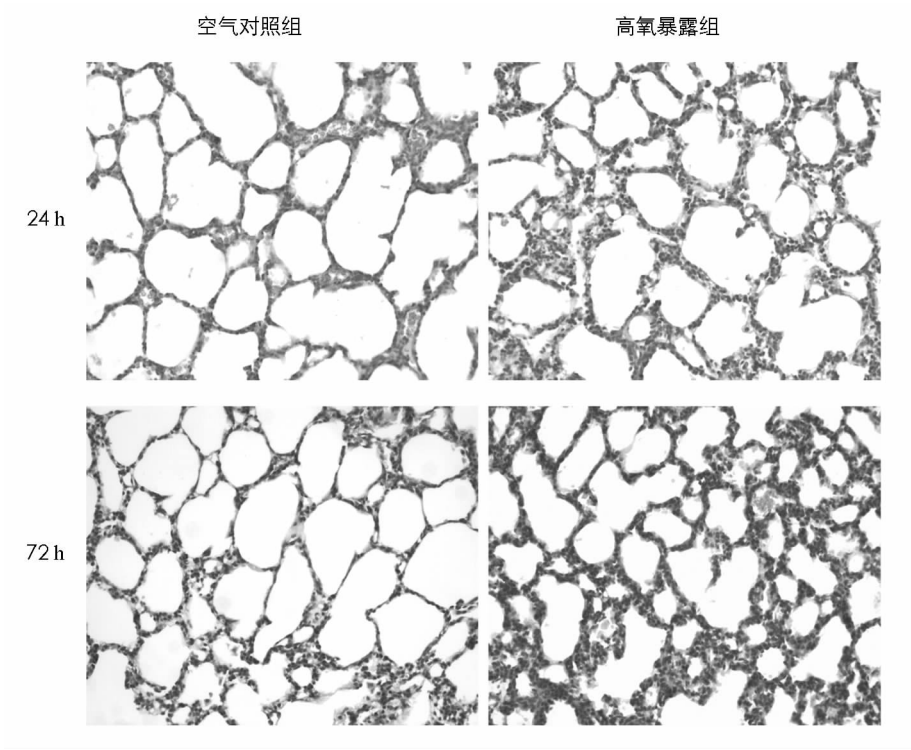
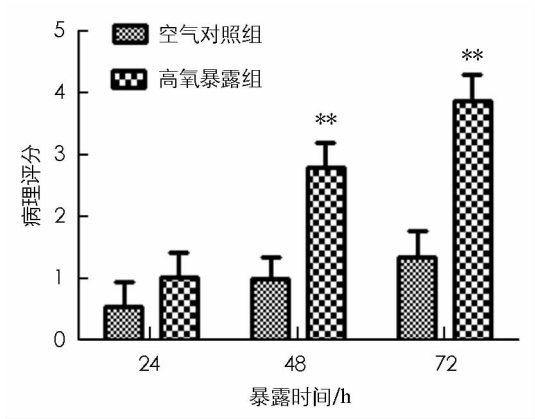
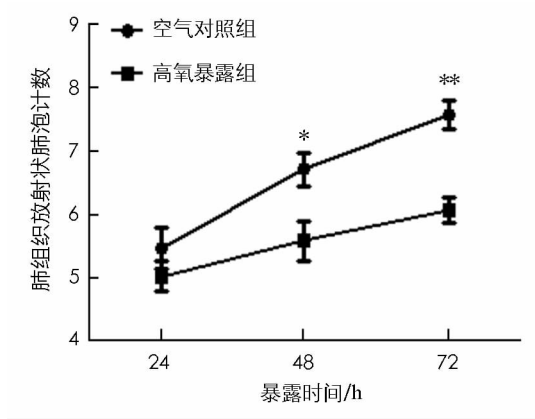


图 2 两组各实验点肺组织病理变化(HE 染色, $\times 200$)



注: ** $P<0.01$.

图 3 两组各实验点肺组织病理评分



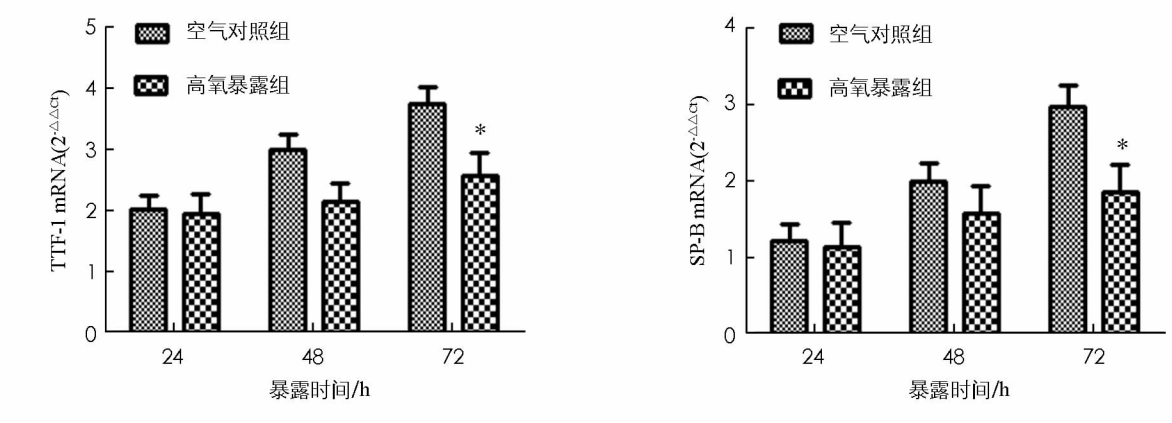
注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图 4 各组各实验点肺组织放射状肺泡计数

4) TTF-1 及 SP-BmRNA 的表达情况: 与空气对照组比较, 随给氧时间的延长, TTF-1 与 SP-B mRNA 表达逐渐下调, 高氧暴露 72 h 时其表达显著降低($t=2.820, t=2.605, P<0.05$)(图 5).

5) TTF-1 及 SP-B 蛋白的动态变化: 免疫荧光标记方法显示高氧暴露 72 h 时, TTF-1 阳性细胞显色为红色, 主要见于肺泡壁上皮细胞及支气管上皮细胞, 与空气对照组比较, 阳性细胞数量减少, 表达降低. SP-B 红色荧光表达的阳性细胞主要分布于肺间隔和肺泡壁上皮细胞(AEC II), 支气管黏膜上皮细胞也可见阳性表达, 阳性表达细胞周围部分可见表达红色荧光的分泌蛋白, 高氧暴露 72 h 时, SP-B 表达较同实验

点空气对照组降低(图 6).



注: * $P<0.05$.

图 5 各组各实验点 TTF-1 及 SP-B mRNA 的表达

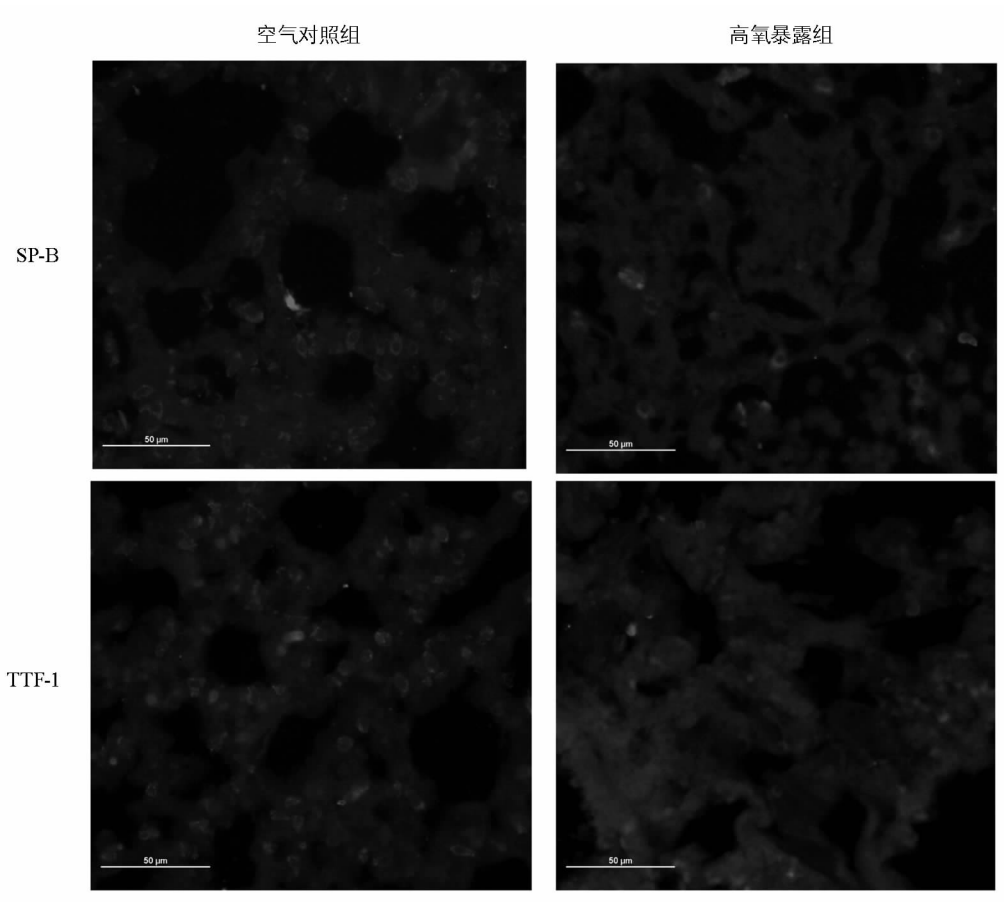


图 6 72 h 时各组各实验点肺组织 TTF-1 及 SP-B 蛋白的荧光表达

3 讨 论

高浓度氧疗被广泛用于新生儿呼吸困难等危重病人的治疗中,然而,长时间暴露于高浓度氧中能引起肺组织损伤.有研究表明^[5],机械通气能引起并加剧肺组织的损伤,其机制可能与肺泡上皮细胞的氧化损伤有关.一方面,高浓度氧暴露过程中促使机体产生具有活性的氧自由基,当氧自由基生成超过机体清除能力后,氧自由基通过干扰细胞代谢,损伤细胞结构(包括上皮、内皮及巨噬细胞)等,造成肺组织损伤.另

一方面,高浓度氧可促进肺部趋化因子及其他促炎因子的分泌,诱导炎症细胞和介质在肺内聚集、激活,引起高氧急性肺损伤的炎症改变.本研究中观察到高氧暴露48 h时,新生小鼠肺组织出现充血、水肿、炎症细胞浸润,即发生了与HALI相似的病理变化,说明新生鼠吸入85%O₂48 h,可引起肺组织的急性损伤,且随着高氧暴露时间的延长,肺组织损伤程度加重.

肺泡Ⅱ型上皮细胞和肺泡Ⅰ型上皮细胞共同构成肺泡上皮细胞的屏障,新生鼠出生后1~4 dⅠ型上皮细胞开始出现,但此时仍以Ⅱ型细胞为主^[6].AECⅡ能合成和分泌生长因子、细胞因子、炎症介质等多种生物活性物质;维持肺泡内外液体平衡;参与肺损伤修复、炎症反应等^[2].甲状腺转录因子(Thyroid transcription factor 1, [TTF-1])是上皮细胞特异性的转录因子,出生后特异性表达于相关肺组织肺泡AECⅡ及支气管上皮,其能调控SP-B及SP-C基因的转录,对肺组织形态发生的维持及肺上皮细胞的分化具有重要的作用^[7].肺表面活性物质(PS)由AECⅡ合成并分泌,是由磷脂及蛋白质组成的混合物,包括4种确切的肺表面活性物质相关蛋白(surfactant-associated proteins, SPs),即SP-A,SP-B,SP-C及SP-D,能降低肺泡表面气-液界面表面张力,维持肺泡的稳定性^[6].其中SP-B主要表达在AECⅡ,研究SP-B在高浓度氧发育中肺组织的表达情况可间接反应AECⅡ的功能及肺损伤修复情况.本研究中,高氧暴露72 h时TTF-1及SP-B mRNA表达较同实验点空气对照组显著下调,同时,免疫荧光标记方法显示TTF-1及SP-B主要表达于AECⅡ及支气管上皮细胞,且阳性细胞表达量也降低,说明高氧抑制了肺泡化的进程,使肺泡形成及AECⅡ损伤修复的能力下降,肺泡上皮细胞的通透性明显增加而出现肺水肿表现.我们前期体外实验结果表明^[8],在高氧损伤细胞模型(FiO₂: 0.8)中,高氧暴露24, 48 h AECⅡ SP-B mRNA及蛋白表达较同时间空气暴露组下调.同时,本研究也显示,高氧暴露48 h时肺组织W/D比值显著升高,同时RAC数目也显著下降,表明高浓度氧引起肺泡上皮细胞氧化损伤,肺泡渗出增多,肺组织湿重增加,有肺水肿的表现.上述分析说明高氧抑制了肺泡化的进程,广泛肺泡上皮细胞的损伤及损伤修复能力的下降使气血屏障通透性明显增加出现肺水肿的表现,促进了ALI的发生,即肺泡上皮的损伤在HALI的发生进程中可能发挥着重要的作用,但其进一步的机制还有待研究.

参考文献:

- [1] KALLET R H, MATTHAY M A. Hyperoxic Acute Lung Injury [J]. *Respir Care*, 2013, 58(1): 123—141.
- [2] CROSBY L M, WATERS C M. Epithelial Repair Mechanisms in the Lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(6): L715—L731.
- [3] 刘芳君,刘莎,符州,等.氧体积分数对新生鼠肺组织损伤的影响[J].*西南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 41(5): 190—193.
- [4] BHANDARI V, CHOO-WING R, HOMER RJ, et al. Increased Hyperoxia-Induced Mortality and Acute Lung Injury in IL-13 Null Mice [J]. *J Immunol*, 2007, 178(8): 4993—5000.
- [5] DOS SANTOS C C. Hyperoxic Acute Lung Injury and Ventilator-Induced/Associated Lung Injury: New Insights into Intracellular Signaling Pathways [J]. *Crit Care*, 2007, 11(2): 126.
- [6] YEE M, VITIELLO P F, ROPER J M, et al. Type II Epithelial Cells are Critical Target for Hyperoxia-Mediated Impairment of Postnatal Lung Development [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(5): L1101—L1111.
- [7] DAS A, ACHARYA S, GOTTIPATI K R, et al. Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) Gene: Identification of ZBP-89, Sp1, and TTF-1 Sites in the Promoter and Regulation by TNF-alpha in Lung Epithelial Cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(4): L427—L440.
- [8] 刘芳君,邓春,郭春宝,等.高氧及TGF-β1对肺泡Ⅱ型细胞上皮间质转化的影响[J].*细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(5): 474—477.

On Role of Alveolar Epithelial Cells in Hyperoxic Acute Lung Injury

LIU Fang-jun, GONG Cai-hui, LIU Sha

Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics,
China International Science and Technology Cooperation base for Child Development and Critical Disorders,
Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China

Abstract: Observed the expressions of thyroid transcription factor-1(TTF-1)and surfactant protein B (SP-B) in the lungs of newborn mice with exposed to hyperoxia in order to explain the possible pathogenesis of hyperoxia acute lung injury(HALI). Totally 30 postnatal day 1 mice, which were randomly divided into hyperoxia exposed group and air control group($n=15$) respectively. hyperoxia exposed for 72 hours induce the HALI. assessed the wet/dry weight(W/D)ratio,observed the changes of lung pathology , injury score and radical alveolar counts . The protein and mRNA expressions of thyroid transcription factor-1(TTF-1) and surfactant protein B (SP-B) were detected by immunofluorescence and real-time PCR after 24,48and72 hours, respectively. Contrasted the air control group, lung tissue gradually showed increased interstitial cell and pulmonary edema at hyperoxia exposed for 48 hours, and W/D ratio and injury scores of 48 hours (all $P<0.05$) were noted increased . RAC were decreased significantly ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of TTF-1 and SP-B in lung tissue were decreased markedly at 72 hours of hyperoxia exposed group compared with the air control group. In newborn mice hyperoxia exposed can induced lung injury , and disrupts pulmonary epithelial may be plays an very important role in the development of HALI .

Key words: Hyperoxic acute lung injury; alveolar epithelial cells; Thyroid transcription factor 1; Surfactant protein B ; Newborn mice

责任编辑 张 枸